



Caracterização molecular e expressão em bactéria de uma cisteíno- protease de ***Theobroma cacao-Moniliophthora perniciosa***

Thyago Hermylly Santana Cardoso¹, Fabienne Micheli², Carlos Priminho Pirovani³, Júlio César de Mattos Cascardo⁴, Abelmon da Silva Gesteira⁵

¹ Discente do Curso de Ciências Biológicas, e-mail: thyago_cardoso@hotmail.com, ² Docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/UESC, e-mail: fabienne.micheli@cirad.fr, ³ Docente do Departamento de Ciências Biológicas/UESC, e-mail: cascardo@labbi.uesc.br, ⁴ Docente do Departamento de Ciências Biológicas, e-mail: cascardo@labbi.uesc.br, ⁵ Docente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular/UESC, e-mail: abelmon@cnpmf.embrapa.br

O fungo *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Singer, agente causador da vassoura-de-bruxa do cacau (Theobroma cacao L.), é atualmente o maior problema fitopatológico das regiões produtoras de cacau. A complexidade do patossistema cacau-*M. perniciosa* e os prejuízos causados pela doença motivaram estudos genômicos e proteômicos do fungo e da interação. Em bibliotecas de cDNA das interações *T. cacao-M. perniciosa* resistente e susceptível, sequenciadas na UESC, foram detectados fragmentos gênicos de diferentes classes de proteases. Esse trabalho objetivou a caracterização molecular do gene *TcCysPr04* e a expressão da respectiva proteína em bactéria. Análises de bioinformática revelaram que o gene possui uma ORF de 526 pb, que codifica uma proteína com 171 aminoácidos, com PM estimado de 19,1 kDa e pI de 8,6. Análises com o programa signalP 3.0 indicou a presença de um peptídeo sinal com provável sítio de clivagem entre os aminoácidos 19 e 20, e, análises com os programas TargetP e PSORT indicaram a provável secreção da proteína para o apoplasto ou localização vacuolar, como ocorre com cisteíno proteases do grupo das aleurinas. A sequência aminoacídica de *TcCisPr04* foi alinhada com outras proteases do gene bank e agrupou com o domínio inibitório de cisteíno-proteases envolvidas em reação de hipersensibilidade a patógenos. Análise no Pfam e ProDom indicou que o domínio inibitório contém 56 aminoácidos, localizados entre as coordenadas 56 e 112. O domínio inibitório da *TcCisPr04* foi clonado em pET28a, sob controle do promotor da *T7* RNA Polimerase. A proteína foi expressa na estirpe de *E. coli*, BL21(DE₃), e induzida com IPTG a 1 mM. A expressão heteróloga do domínio inibitório foi visualizada em gel SDS-PAGE 15% e uma banda com massa molecular esperada de aproximadamente 19 kDa foi observada. A proteína purificada por cromatografia em colunas contendo níquel e não exibiu atividade inibitória sobre a papaína do mamão em ensaios com o substrato cromogênico BAPNA. Além disso, a proteína também não afetou o crescimento de hifas do fungo *M. perniciosa*. Ensaios ainda precisam ser realizados para avaliar se esta proteína é da classe regulatória dos zimógenos ou esse domínio inibitório exibe interação com o domínio catalítico, mesmo após clivagem proteolítica.

Palavras-Chave: protease, domínio inibidor, Theobroma cacao.

Agência Financiadora: CNPq.